

L14 ANSWER 1 OF 1 CAPLUS COPYRIGHT 2004 ACS on STN

ACCESSION NUMBER: 1996:245479 CAPLUS

DOCUMENT NUMBER: 124:290284

TITLE: Preparation of partial peptides of vascular permeability factor and monoclonal antibody recognizing the peptides and anticancer agent containing the monoclonal antibody

INVENTOR(S): Okamoto, Masaji; Hanatani, Mitsuya; Kondo, Shinichi; Asano, Makoto; Matsumoto, Tomoe; Matsuo, Katsuhiko; Oomori, Iwao

PATENT ASSIGNEE(S): Toa Gosei Kk, Japan

SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 9 pp.

CODEN: JKXXAF

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: Japanese

FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 07330795	A2	19951219	JP 1994-125569	19940607
PRIORITY APPLN. INFO.:			JP 1994-125569	19940607

AB The title peptides having at least one amino acid sequence represented by Tyr-Pro-Asp-Glu-Ile-Glu-Tyr-Ile-Phe-Lys (I), Gly-Cys-Cys-Asn-Glu (II), and Ser-Phe-Leu-Gln-His-Asn-Lys-Cys (III), which are useful as antigens for prodn. of monoclonal antibody against vascular permeability factor, and vascular permeability factor monoclonal antibody recognizing said peptides, which are useful for diagnosis of, monitoring the progress of, and treatment of cancer and other diseases, were prepd. Thus, 57 peptides having the amino acid sequences each corresponding to the 10 continuous amino acid sequence of human vascular permeability factor(1-121) were prepd. by the multi-pin peptide synthesis on Fmoc-beta.-alanine-introduced pin blocks for a 96-well assay plate and assayed by an enzyme immunoassay for reaction with MV415 antibody to human vascular permeability factor, which was produced by mice implanted i.p. with mouse spleen-mouse myeloma hybridomas (prepn. given). The 6 peptides including H-Tyr-Pro-Asp-Glu-Ile-Glu-Tyr-Ile-Phe-Lys-OH, H-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn-Asp-Glu-OH, H-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn-Asp-Glu-Gly-Leu-OH, H-Gly-Cys-Cys-Asn-Asp-Glu-Gly-Leu-Glu-Cys-OH, H-Glu-Met-Ser-Phe-Leu-Gln-His-Asn-Lys-Cys-OH, and H-Ser-Phe-Leu-Gln-His-Asn-Lys-Cys-Glu-Cys-OH, strongly reacted with MV415 antibody, which suggested that MV415 recognizes the above 3 amino acid sequences I, II, and III.

IT 175647-69-5P

RL: BAC (Biological activity or effector, except adverse); BSU (Biological study, unclassified); SPN (Synthetic preparation); THU (Therapeutic use); BIOL (Biological study); PREP (Preparation); USES (Uses)

(prepn. of partial peptides of vascular permeability factor and monoclonal antibody recognizing the peptides and anticancer agents contg. the monoclonal antibody)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-330795

(43) 公開日 平成7年(1995)12月19日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/47		8318-4H		
A 6 1 K 39/395	A D U T			
C 0 7 K 16/18				
C 1 2 N 15/09	Z N A			
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		審査請求	未請求	請求項の数 3 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-125569

(22) 出願日 平成6年(1994)6月7日

(71) 出願人 000003034

東亜合成株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72) 発明者 岡本 雅次

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成化学

工業株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 花谷 満也

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成化学

工業株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 近藤 伸一

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成化学

工業株式会社つくば研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドおよびモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【構成】 ヒト血管透過性因子の一部のペプチド及び該ペプチドを認識する血管透過性因子モノクローナル抗体。

【効果】 本発明のペプチドは、血管透過性因子に対するモノクローナル抗体を作製するための抗原、生化学試験、癌やその他の疾病の診断薬等として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のペプチドを認識する血管透過性因子モノクローナル抗体。

【請求項3】 請求項2記載の血管透過性因子モノクローナル抗体を有効成分とする抗癌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒト血管透過性因子の一部のペプチドおよび該ペプチドを認識する血管透過性因子モノクローナル抗体並びにその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】血管新生すなわち毛細血管内皮細胞の増殖、移動および組織への浸潤は胎児の生長、創傷治癒、癌細胞の増殖などの生理的または病理的現象において重要な役割を果たしていることが知られている[Folkman, J., Cancer Res. 46:467(1986)]。血管新生を誘導する因子としては、直接的に血管内皮細胞に作用する物質として塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor, VEGF/VPF)、血小板由来内皮細胞増殖因子(platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)などが、また間接的に血管内皮細胞に作用する物質としてtransforming growth factor- α (TGF- α)、transforming growth factor- β (TGF- β)、angiogenin、tumor necrosis factor- α (TNF- α)などが知られている[Folkman, J. & Shing, Y., J. Biol. Chem., 267:10931(1992)]。

【0003】血管透過性因子に関しては、マウス、ラット、モルモット、ウシおよびヒトの正常または腫瘍細胞株で分泌されており、組織別では脳、下垂体、腎臓、卵巣に存在することが明らかにされている[(Ferrara, N., et al. Endocrine Reviews 13:18(1992))。また、ヒト血管透過性因子は乳癌の血管新生と転移[Weider, N., et al. N. Engl. J. Med. 324:1(1991)]や腎細胞癌の血管新生[医学のあゆみ, 168:231(1994)]、あるいは網膜疾患における血管新生[Adamis, A. P. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 193:631(1993)]に関与していることが報告されている。さらに血管透過性因子は標的細胞表面に存在する受容体 (flt, fms-like tyrosine kinase) と結合することにより細胞内へシグナルを伝達することが明らかになっている[De Vries, C. et al. Science, 255:989(1992)]が、血管透過性因子とその受容体との相互作用機構やシグナル伝達機構については詳細には解明されていない。

【0004】ヒト血管透過性因子遺伝子についてはそのcDNAがすでに単離されて塩基配列が決定され、アミノ酸配列も推定されている。この血管透過性因子遺伝子からアミノ酸残基数の異なる4種類の蛋白(アミノ酸残基数が121個、165個、189個、206個の4種類)が作られ、それらの中で121個のアミノ酸残基数のもの(VPF121)と165個のアミノ酸残基数のもの(VPF165)が血管内皮細胞に対する作用が強いと言われている[(Ferrara, N., et al. Endocrine Reviews 13:18(1992))。VPF121はVPF165のカルボキシル末端付近の44個のアミノ酸が欠損したものであるが、VPF121とVPF165の間に、血管内皮細胞に対する作用の違いがあるかどうかについては明らかでない。

【0005】一方、モノクローナル抗体は抗血清(ポリクローナル抗体)に比べて特異性が高く、抗原決定基が単一であるため必要な親和性の抗体を選択でき、恒常的に均一な品質のものを得ることができる。したがって、現在では生化学的な解析や臨床的には種々の疾患の診断に広くモノクローナル抗体が使用されている。

【0006】ヒト血管透過性因子に対するモノクローナル抗体もVPF165についてはすでに取得されているが、その抗体の血管透過性因子中の反応部位は明らかでない[Kim, K. J. et al. Growth Factors, 7:53(1992)]。またマウスモノクローナル抗体の作製技術はKohler & Milsteinによりすでに確立されており[Kohler & Milstein, Nature 256:495(1975)]、蛋白質、ペプチド、糖質、脂質あるいは低分子化合物に対するモノクローナル抗体の作製が可能である。しかしながら効率よくモノクローナル抗体を作製するためには免疫する抗原として何を用いるかが重要である。すなわち、血管透過性因子のような蛋白質(高分子物質)を抗原とする場合、モノクローナル抗体と反応する部位は分子表面に存在するアミノ酸であるため、抗原分子中のどのアミノ酸が分子表面に存在するかが明らかにすれば、容易にモノクローナル抗体を作製できると考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明はVPF121の一部のペプチド及びこれと反応するモノクローナル抗体並びにその用途を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ヒト血管透過性因子のアミノ酸配列中の連続した10個のアミノ酸からなる57種類のペプチドにおいて、このうち遺伝子工学的に得られた血管透過性因子に対するモノクローナル抗体と反応するペプチド及び該ペプチドと反応するモノクローナル抗体を提供することに成功し、本発明を完成させた。

【0009】即ち、本発明は、配列番号2で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも1

つのアミノ酸配列を有するペプチドである。更に、本発明は、前記ペプチドを認識する血管透過性因子モノクローナル抗体である。更に、本発明は、前記血管透過性因子モノクローナル抗体を有効成分とする制癌剤である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】本発明のペプチドは、ヒト血管透過性因子（以下「VPF」と略す）モノクローナル抗体と特異的に反応するものである。

(1) モノクローナル抗体の製造

本発明のモノクローナル抗体は、マウスをヒトVPFで免疫し、脾細胞を取り出し、これとマウスミエローマ細胞とを融合して得たハイブリドーマ細胞を培養することにより製造することができる。このハイブリドーマの製造は、例えばKohlerとMilsteinの方法〔Nature 256:495 (1975)〕等により行うことができる。

【0011】① 抗体産生細胞の調製

免疫用マウスには、BALB/C、C57BL/6系マウス、C3H系マウス等が用いられる。そして、免疫マウス1匹（8～12週齢）に対してVPF50～100 μ gの量を抗原として2～3週間ごとに2～3回免疫を行う。マウスの飼育及び脾細胞の採取は常法に従ってよい。尚、免疫の際には、VPFに例えばグルタチオンS-トランスフェラーゼ等を融合させ、得られた蛋白質を抗原として用いることもできる。

【0012】② ミエローマ細胞の調製

ミエローマ細胞としては、Sp2/0-Ag14(Sp2)、P3/NS1/1-Ag4-1(NS-1)、P3X63Ag8U.1等が挙げられる。これら細胞の継代培養は常法に従う。

③ 細胞融合

脾細胞とミエローマ細胞とを1:1～10:1の割合で混合し、分子量1000～4000のポリエチレングリコール（以下PEGという）、ダルベッコ改変イーグル培地中、両細胞を30～40℃、1～3分間インキュベートすることにより細胞融合を行うことができる。

【0013】④ ハイブリドーマの選択

融合細胞（ハイブリドーマ）の選択は、ヒポキサンチン（ 10^{-5} ～ 10^{-6} M）、アミノプテリン（ 10^{-6} ～ 10^{-7} M）、チミジン（ 10^{-5} ～ 10^{-6} M）、ペニシリン（100～200単位/ml）、牛胎児血清（10～20%）、ストレプトマイシン（100～200 μ g/ml）、2-メルカプトエタノール（ 10^{-5} ～ 10^{-6} M）を含む基礎培地を用いて培養し、生育してくる細胞をハイブリドーマとして選択することができる。基礎培地としては、動物細胞の培養に一般に用いられるRPMI 1640培地、イーグルMEM培地、イスコフ改変ダルベッコ培地等が用いられる。

【0014】⑤ ハイブリドーマの培養

ハイブリドーマのクローン化は、限界希釈法により、少なくとも2回繰り返して行う。ハイブリドーマを通常の動物細胞の培養と同様にして培養すれば、培地中に本発明の抗体(MV415)が産生される。通常、5～ 10×10^5 個

/mlのハイブリドーマ細胞を、牛胎児血清（10%）、ペニシリン（100単位/ml）、ストレプトマイシン（100 μ g/ml）、2-メルカプトエタノール（ 5×10^{-5} M）を含むRPMI 1640培地中で5% CO₂存在下、37℃、3～4日間培養することによって培養液中に抗体が分泌、蓄積される。また、ハイブリドーマ細胞をBALB/C系マウスの腹腔内に移植して増殖することにより、腹水中に本発明の抗体を蓄積させることもできる。

【0015】⑥ モノクローナル抗体の精製

ハイブリドーマ細胞の培養液中又は腹水中に蓄積したモノクローナル抗体は以下のようにして採取され、精製される。即ち、従来から用いられている硫酸分画法、PEG分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いる方法である。また、プロテインAやプロテインG等のアフィニティークロマトグラフィーによる方法も利用できる。モノクローナル抗体の選別には、酵素免疫測定法、ウエスタンブロッティング法等が用いられる。また、モノクローナル抗体のIgGアイソタイプの決定は、モノクローナル抗体の酵素免疫測定法又はオクタロニー法によって行うことができる。

【0016】(2) モノクローナル抗体の反応部位の同定

① VPFのアミノ酸配列の一部分に相当するペプチドの作製

ヒトVPF121のアミノ末端からのアミノ酸残基数が奇数のアミノ酸から、連続した10個のアミノ酸を1つのペプチドとして、57種類のペプチドを設計する。設計された各ペプチドは、例えばマルチピンペプチド合成法〔Maeji, N. J., et. al. J. Immunol. method, 134:23(1990)〕等により合成することができる。尚、合成したペプチドの定量はオルトフタルアルデヒドを用いてアミノ基を定量することにより行うことが可能である。

【0017】② MV415抗体と反応するペプチドの同定

以上のようにして合成した57種のペプチドはヒトVPF121の全領域に対応するものである。したがって、57種のペプチドとMV415抗体との反応性を調べることによりMV415抗体がVPFのどの部位に反応しているかを明らかにすることができる。反応性の測定には、酵素免疫測定法、オクタロニー法、ウエスタンブロッティング法等が用いられる。

【0018】次に、本発明のVPFモノクローナル抗体を制癌剤として投与する場合には、投与する対象を特に限定しない。例えば、個々の癌種の予防あるいは治療することを特異目的として用いることができる。また、投与する方法は経口又は非経口でもよく、経口投与には舌下投与を包含する。非経口投与には、注射、例えば皮下、筋肉、静脈注射、点滴、座剤等を含む。また、その投与量は動物か人間かによって、また、年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができ

る。この場合、本発明のVPFモノクローナル抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬理的に使用し得る担体の組成物として投与される有効量は0.1~100mg/kg体重/日であり、1日1回から数回に分けて投与される。

【0019】本発明のVPFモノクローナル抗体を経口投与する場合、それに適用される錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤等は、通常それらの組成物中に製剤一般に使用される結合剤、包含剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤のような添加物を含有する。また、経口用液体製剤としては、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等いずれの状態であってもよく、また、使用する際に再溶解させる乾燥生成物であってもよい。更に、その組成物は添加剤、保存剤のいずれを含有してもよい。

【0020】また、非経口投与の場合には、安定剤、緩衝剤、保存剤、等強化剤等の添加剤を含有し、通常単位投与量アンプル若しくは多投与量容器又はチューブの状態を提供される。上記の組成物は使用する際に適当な担体、例えば発熱物質不含の滅菌した水で再溶解させる粉体であってもよい。本発明のVPFモノクローナル抗体が制癌剤として有効であることを裏付ける薬理試験例を以下に説明する。

【0021】〔試験例〕PLC/PRF/5及びHT-1080のヌードマウス腫瘍系を用いて本発明のモノクローナル抗体の抗腫瘍実験及び毒性試験を以下の通り行った。予め、腫瘍細胞PLC/PRF/5又はHT-1080をマウス（ヌードマウス）に接種し、腫瘍塊ができるまで飼育した。次いで、腫瘍塊を2mm角程度に切り取り、これを別のヌードマウスの腹部皮下に移植した。

【0022】移植翌日より本発明のモノクローナル抗体を、100μg/マウス/日の投与量で合計10回投与した（投与日は、移植後1~4、7~11及び14日目とした）。また、モノクローナル抗体を投与しないものを対照とした。尚、実験に使用したマウスは、それぞれの腫瘍系について、モノクローナル抗体投与群、対照群共に4匹で行った。

【0023】各群と腫瘍の形成及び腫瘍の大きさ（体積）を比較した結果、図1及び図2に示す通り、いずれの腫瘍塊を移植した場合でも、腫瘍増殖抑制活性が確認された。図1はPLC/PRF/5系を、図2はHT-1080系の腫瘍塊を移植した場合の結果を示す。また、図1及び図2中、「□」はモノクローナル抗体投与群を、「●」は対照群を表す。一方、本発明のモノクローナル抗体をヌードマウスに投与しても体重減少は認められず、また、毛並みや行動も正常なヌードマウスと差がないことから、毒性は、非常に低いものと考えられる。

【0024】

〔実施例〕以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるもの

ではない。

【0025】〔実施例1〕

（1）VPFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

単離したヒトVPF cDNAを、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）との融合蛋白（GST-VPF）として大腸菌で発現させることにより抗原として使用する蛋白を得た。次いで、得られた蛋白を抗原として常法に従ってマウスモノクローナル抗体を作製した。すなわち、GST-VPF（100μg）をフロイント完全アジュバントと等量混合し、該混合物をBALB/Cマウスの腹腔内に0日、14日後、25日後の3回投与することにより免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞（SP2）とをポリエチレングリコール存在下で1分間インキュベーションすることにより細胞融合させた。得られた融合細胞をHAT培地〔ヒポキサンチン（ 1×10^{-4} M）、アミノプテリン（ 4×10^{-7} M）、チミジン（ 1.6×10^{-5} M）、ペニシリン（100単位/ml）、ストレプトマイシン（100μg/ml）、牛胎児血清（20%）、2-メルカプトエタノール（ 2×10^{-5} M）を含むRPMI 1640培地〕中で培養することによりハイブリドーマを選別した。得られたハイブリドーマは限界希釈法によりクローニングした。

【0026】一方、ヒトVPFを産生する酵母を、単離したヒトVPF cDNAを含む環状DNAを酢酸リチウム法で酵母*Saccharomyces cerevisiae*に導入することにより作成し、この酵母の培養液中から陽イオン交換クロマトグラフィー（東ソー製；TSK-SP650）、硫酸沈殿及びゲル濾過クロマトグラフィー（ファルマシア製；Superdex-75）を行うことにより、酵母由来のヒトVPF（以下「YVPF」とする）を調製した。このYVPFとクローン化したハイブリドーマの培養上清の反応性を酵素免疫測定法により調べ、YVPFと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別した。またこのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をMV415と命名した。尚、得られたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-14346として寄託されている。

【0027】（2）VPFモノクローナル抗体の調製
選別したハイブリドーマをヌードマウスの腹腔内に移植し、モノクローナル抗体を大量に含む腹水を採取した。この腹水中からプロテインGアフィニティカラム（MAbTrap GII、ファルマシア社製）を用いてモノクローナル抗体を精製した。また抗体のクラスを抗マウス免疫グロブリンサブクラス特異的抗体を用いた酵素免疫測定法により調べた結果、MV415抗体のクラスはIgG2aであった。

【0028】（3）抗VPF ポリクローナル抗体の作製
GST-VPFを抗原として常法によりウサギを免疫した。抗体価の上昇したウサギの血清を分離し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによりウサギ抗VPFポリクロー

ナル抗体のIgG画分を得た。IgG画分の一部をペプシンで消化してF(ab')₂を調製し、マレイミド法によりペルオキシダーゼと結合させ、ペルオキシダーゼ標識したウサギ抗VPFポリクローナル抗体を得た。

【0029】(4)モノクローナル抗体とYVPFとの反応性

MV415抗体とYVPFとの反応の特性を酵素免疫測定法により調べた。まず96穴の酵素免疫測定用プレートにMV415抗体(5μg/ml)を入れ4℃で一晩放置することによりMV415抗体をプレートに吸着させた。0.1%ウシ血清アルブミン(以下「BSA」とする)を含むPBSでプレートの穴を6回洗浄した後、1%BSAを含むPBSを穴一杯に入れ室温で1時間放置した。穴から1%BSAを含むPBSを除いた後、種々の濃度のYVPFを入れ室温で1時間放置した。0.1%BSAを含むPBSで6回洗浄後ペルオキシダーゼ標識したウサギ抗VPFポリクローナル抗体(0.1%BSA, PBS溶液)を入れ室温で1時間放置した。0.1%BSAを含むPBSで6回洗浄後0.2mg/mlオルトフェニレンジアミンおよび0.015%過酸化水素を含む0.15Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を入れて発色させた。反応は10%硫酸を加えて停止させた後、吸光度(OD 490/650)を測定した。以上の方法で測定した結果をグラフにプロットし図3に示した。YVPFの濃度が10~200 ng/mlの範囲で吸光度の増加に直線性が認められ、MV415抗体がYVPFと特異的に反応することおよびこの測定系で10~200 ng/mlのYVPFが定量できることがわかった。

【0030】(5)モノクローナル抗体の反応部位の同

定

(a) VPFのアミノ酸配列の一部分に相当するペプチドの作製

ヒトVPF121のアミノ末端からのアミノ酸残基数が奇数のアミノ酸から、連続した10個のアミノ酸を1つのペプチドとして57種のペプチドを設計し、各ペプチドをマルチピンペプチド合成法[Maeji, N, J, et. al. J. Immunol. method, 134:23(1990)]により合成した。

【0031】まず96穴アッセイプレート用ピンブロックのピンの先端に導入された9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)-β-アラニンからピペリジンによりFmoc基を除去した後、ジシクロヘキシルボジイミドとヒドロキシベンゾトリアゾール存在下でFmoc-アミノ酸を縮合させた。N,N-ジメチルホルムアミドで洗浄後、再びジシクロヘキシルボジイミドとヒドロキシベンゾトリアゾール存在下でFmoc-アミノ酸を縮合させ、この操作を繰り返すことにより目的のペプチドを合成した。縮合反応終了後、無水酢酸でアセチル化を行い、さらにトリフルオロ酢酸で側鎖保護基を除去した。ピン上で合成したペプチドはピンを中性溶液中に浸すことにより切り出した。合成したペプチドの定量はオルトフタルアルデヒドを用いてアミノ基を定量することにより行った。合成した57種のペプチドのアミノ酸配列を以下の表1に示す。

【0032】

【表1】

識別番号	配列場所	識別番号	配列場所
1	1-10(AlaProMetAlaGluGlyGlyGlyGlnAsn)	30	59-68(GlyCysCysAsnAspGluGlyLeuGluCys)
2	3-12(MetAlaGluGlyGlyGlyGlnAsnHisHis)	31	61-70(CysAsnAspGluGlyLeuGluCysValPro)
3	5-14(GluGlyGlyGlyGlnAsnHisHisGluVal)	32	63-72(AspGluGlyLeuGluCysValProThrGlu)
4	7-16(GlyGlyGlnAsnHisHisGluValValLys)	33	65-74(GlyLeuGluCysValProThrGluGluSer)
5	9-18(GlnAsnHisHisGluValValLysPheMet)	34	67-76(GluCysValProThrGluGluSerAsnIle)
6	11-20(HisHisGluValValLysPheMetAspVal)	35	69-78(ValProThrGluGluSerAsnIleThrMet)
7	13-22(GluValValLysPheMetAspValTyrGln)	36	71-80(ThrGluGluSerAsnIleThrMetGlnIle)
8	15-24(ValLysPheMetAspValTyrGlnArgSer)	37	73-82(GluSerAsnIleThrMetGlnIleMetArg)
9	17-26(PheMetAspValTyrGlnArgSerTyrCys)	38	75-84(AsnIleThrMetGlnIleMetArgIleLys)
10	19-28(AspValTyrGlnArgSerTyrCysHisPro)	39	77-86(ThrMetGlnIleMetArgIleLysProHis)
11	21-30(TyrGlnArgSerTyrCysHisProIleGlu)	40	79-88(GlnIleMetArgIleLysProHisGlnGly)
12	23-32(ArgSerTyrCysHisProIleGluThrLeu)	41	81-90(MetArgIleLysProHisGlnGlyGlnHis)
13	25-34(TyrCysHisProIleGluThrLeuValAsp)	42	83-92(IleLysProHisGlnGlyGlnHisIleGly)
14	27-36(HisProIleGluThrLeuValAspIlePhe)	43	85-94(ProHisGlnGlyGlnHisIleGlyGluMet)
15	29-38(IleGluThrLeuValAspIlePheGlnGlu)	44	87-96(GlnGlyGlnHisIleGlyGluMetSerPhe)
16	31-40(ThrLeuValAspIlePheGlnGluTyrPro)	45	89-98(GlnHisIleGlyGluMetSerPheLeuGln)
17	33-42(ValAspIlePheGlnGluTyrProAspGlu)	46	91-100(IleGlyGluMetSerPheLeuGlnHisAsn)
18	35-44(IlePheGlnGluTyrProAspGluIleGlu)	47	93-102(GluMetSerPheLeuGlnHisAsnLysCys)
19	37-46(GlnGluTyrProAspGluIleGluTyrIle)	48	95-104(SerPheLeuGlnHisAsnLysCysGluCys)
20	39-48(TyrProAspGluIleGluTyrIlePheLys)	49	97-106(LeuGlnHisAsnLysCysGluCysArgPro)
21	41-50(AspGluIleGluTyrIlePheLysProSer)	50	99-108(HisAsnLysCysGluCysArgProLysLys)
22	43-52(IleGluTyrIlePheLysProSerCysVal)	51	101-110(LysCysGluCysArgProLysLysAspArg)
23	45-54(TyrIlePheLysProSerCysValProLeu)	52	103-112(GluCysArgProLysLysAspArgAlaArg)
24	47-56(PheLysProSerCysValProLeuMetArg)	53	105-114(ArgProLysLysAspArgAlaArgGlnGlu)
25	49-58(ProSerCysValProLeuMetArgCysGly)	54	107-116(LysLysAspArgAlaArgGlnGluAsnPro)
26	51-60(CysValProLeuMetArgCysGlyGlyCys)	55	109-118(AspArgAlaArgGlnGluAsnProCysGly)
27	53-62(ProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn)	56	110-120(AlaArgGlnGluAsnProCysGlyProCys)
28	55-64(MetArgCysGlyGlyCysCysAsnAspGlu)	57	113-121(GlnGluAsnProCysGlyProCysSer)
29	57-66(CysGlyGlyCysCysAsnAspGluGlyLeu)		

【0033】表中、1から57までの数字はペプチド識別番号を示す。尚、「配列場所」に記載した番号(m-n)は、配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち何番目(m番目)から何番目(n番目)までの位置に相当するものであるかを意味する。例えば、識別番号1の配列場所は、配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、第1番目から第10番目までを意味し、括弧内はそのアミノ酸の表示(第1番目のアラニン～第10番目のアスパラギン)である。

【0034】(b) MV415抗体と反応するペプチドの同定

以上のようにして合成した57種のペプチドは、ヒトVPP1 21の全領域に対応するものである。したがって、57種のペプチドとMV415抗体との反応性を調べることで、MV415抗体がVPPのどの部位に反応しているかを明らかにすることができる。そこで、酵素免疫測定法により57種のペプチドとMV415抗体との反応性を調べた。

【0035】96穴スミロンAプレート(住友ベークライト社製)に2%グルタルアルデヒドを入れ室温で2時間放置した後水で洗浄し、57種の10 μ Mペプチド溶液を入れ4℃で一晩放置した。0.1%BSAを含むPBSでプレートの穴を6回洗浄した後、1%BSAを含むPBS

を入れて室温で1時間放置した。1%BSAを含むPBSを除いた後、ウサギ抗VPP抗体(0.1%BSA, PBS溶液)を入れ室温で1時間放置した。0.1%BSAを含むPBSで6回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識したヒツジ抗ウサギIgG(カッセル社; 0.1%BSA, PBS溶液)を入れ室温で1時間放置した。0.1%BSAを含むPBSで6回洗浄後0.2mg/mlオルトフェニレンジアミンおよび0.015%過酸化水素を含む0.15Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を入れて発色させた。反応は10%硫酸を加えて停止させた後、吸光度(OD490/650)を測定した。以上の方法で測定した結果をグラフにプロットし、図4に示した。

【0036】MV415抗体は57種類のペプチドの中でペプチド識別番号20番、28番、29番、30番、47番、48番の6つのペプチドに強く反応した。ペプチド識別番号28、29及び30番のペプチドには、順に「グリシン、システイン、システイン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸」という配列が共通に含まれていることより、MV415抗体は配列番号1に記載の第59～64番目のアミノ酸配列部分と反応していると考えられる。同様にペプチド識別番号47及び48番のペプチドには、順に「セリン、フェニルアラニン、ロイシン、グルタミン、ヒスチジン、アスパラギン、リジン、システイン」という配列が

共通に含まれていることより、この領域ではMV415抗体は配列番号1に記載の第95～102番目のアミノ酸配列部分と反応しているものと考えられる。

【0037】したがって、MV415抗体は、配列番号1に記載したVPPのアミノ酸配列中、第39～48番目のアミノ酸配列（配列番号2）、第59～64番目のアミノ酸配列（配列番号3）および第95～102番目のアミノ酸配列（配列番号4）を認識しているものと考えられる。

【0038】抗体はタンパク質の表面に露出している部分を認識すると考えられるため、この3種類のアミノ酸配列部分はVPPの表面に露出している部分であると言える。また、モノクローナル抗体は抗原決定基が単一であると言われているが、高次構造をとっている蛋白質などの高分子物質が抗原の場合は抗体が立体的に抗原を認識し、蛋白質の一次構造レベルで抗体の反応性を調べた時に二箇所以上の不連続なアミノ酸配列に反応することがある。MV415抗体がVPP中の三箇所のアミノ酸配列部分に反応したことより、本抗体は三箇所のアミノ酸配列部分を立体的に同時に認識していると考えられる。

【0039】微量タンパク質やウイルスの研究を行う場合、現在ではその遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列よりタンパク質のアミノ酸配列が予想できる。このアミノ酸配列をもとにして親水性の高い部位を探索し、その部位の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を作製して免疫学的解析に用いている。親水性の高い部位の探索にはHoop&Woodsらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824(1981)]などを用いて解析しているが、あらゆるタンパク質にあてはまるとは限らない。したがって、タンパク質の表面に露*

配列：

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys
1				5				10					15		
Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu
			20					25					30		
Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys
			35					40					45		
Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu
			50					55					60		
Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile
			65					70					75		80
Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe
			85					90					95		
Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg
			100					105					110		
Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly	Pro	Cys	Ser							
			115					120							

【0043】配列番号：2

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

*出している部位が明らかな場合は容易に抗体を作製できると考えられる。

【0040】以上のことから、配列番号2、3及び4に記載したアミノ酸配列を有するペプチドは、ヒトVPPに対するモノクローナル抗体を作製する際の抗原として有用であると考えられる。また、前記ペプチドと反応する本発明のモノクローナル抗体は、VPPの生化学的な解析、例えばVPP受容体に対するVPPの結合様式の解析をするための試薬として有用である。更に、本発明のモノクローナル抗体は、癌やその他の疾病の診断および疾病の進行や治療効果の判定などに広く利用することができる。

【0041】

【発明の効果】本発明により、VPPの一部分のペプチド及びこれと反応するモノクローナル抗体が提供される。本発明のペプチドは、VPPに対するモノクローナル抗体を作製するための抗原として有用であり、また、該ペプチドと反応する本発明のモノクローナル抗体は、VPPの生化学的な解析をするための試薬として有用である。更に、本発明のモノクローナル抗体は、癌やその他の疾病の診断および疾病の進行や治療効果の判定などに広く利用することができる。

【0042】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：121

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列の種類：ペプチド

13

配列:

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys

1 5 10

【0044】配列番号: 3

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Gly Cys Cys Asn Asp Glu

1 5

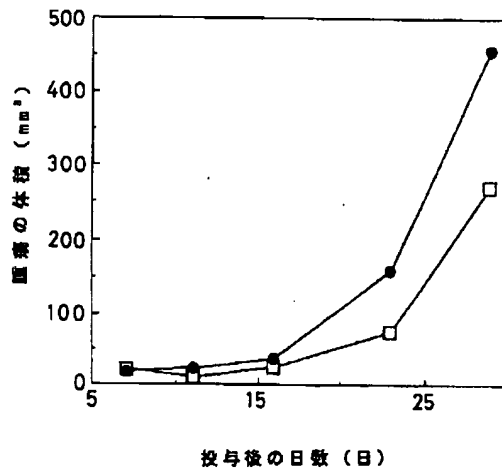
【0045】配列番号: 4

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

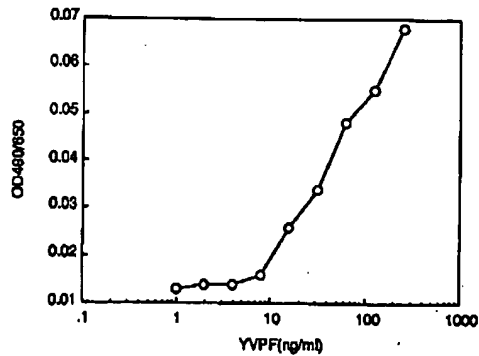
トポロジー: 直鎖状

【図1】



投与後の日数 (日)

【図3】



YVPF (ng/ml)

14

配列の種類: ペプチド

配列:

Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys

1 6

【図面の簡単な説明】

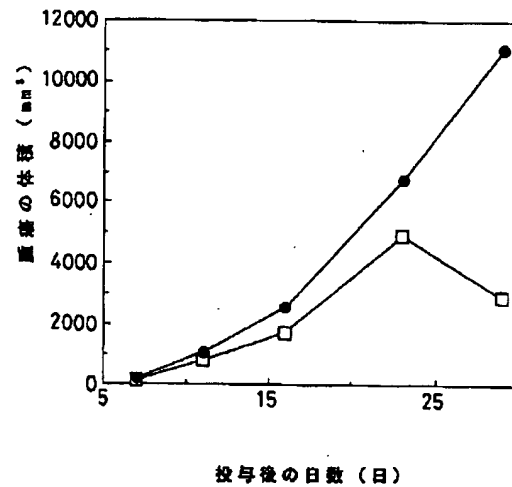
【図1】MV415抗体の抗腫瘍活性を示す図である。

【図2】MV415抗体の抗腫瘍活性を示す図である。

【図3】MV415抗体のYVPFに対する認識特性を示す図である。

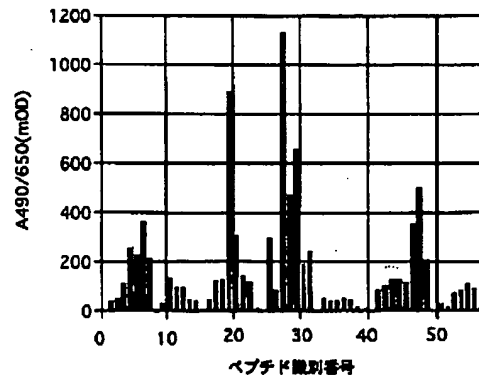
10 【図4】ヒトYVPF121中の一部分に相当する57種のペプチドに対するMV415抗体の認識を示す図である。

【図2】



投与後の日数 (日)

【図4】



ペプチド識別番号

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	C	9282-4B		
21/08		9358-4B		
//(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:865)				
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				
(72)発明者 浅野 誠			(72)発明者 松尾 克彦	
茨城県つくば市大久保2番 東亜合成化学			茨城県つくば市大久保2番 東亜合成化学	
工業株式会社つくば研究所内			工業株式会社つくば研究所内	
(72)発明者 松本 友恵			(72)発明者 大森 巖	
茨城県つくば市大久保2番 東亜合成化学			茨城県つくば市大久保2番 東亜合成化学	
工業株式会社つくば研究所内			工業株式会社つくば研究所内	